

## OBTENCIÓN DE ALCALOIDES A PARTIR DE CORTEZA Y MADERA DE LA ESPECIE *Rollinia pittieri* (ANNONACEAE)

### RESUMEN

De los extractos de corteza y madera de *Rollinia pittieri* se aislaron e identificaron, cuatro alcaloides, dos con núcleo oxoaporfínico: *O*-metilmoschatolina **1**, Liriodenina **2** y dos con núcleo Nor-aporfínico como la Anonaina **3** y la Nornuciferina **4**. El proceso de aislamiento y purificación de todos los alcaloides obtenidos fue llevado a cabo mediante la aplicación de diferentes técnicas cromatográficas (CC, CCD y CCDP). La elucidación estructural se realizó mediante la utilización de técnicas espectroscópicas tales como IR, UV, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C mono y bidimensional y EM, así como también por comparación con muestras auténticas.

A los extractos cloroformicos obtenidos de corteza y madera, se les realizó la evaluación de la actividad antioxidante, utilizando la metodología del DPPH, obteniéndose una buena capacidad captadora de radicales libres para los extractos ensayados.

**PALABRAS CLAVES:** Alcaloides, Annonaceae, Aporfínicos, Oxoaporfínicos., *Rollinia pittieri*, Antioxidantes.

### ABSTRACT

*From the extracts taken from the bark and wood of Rollinia pittieri four alkaloids were isolated and identified, two of them with an oxoaporphine nucleus: O-methylmoschatoline 1, Liriodenine 2 and the other ones with a Nor-aporphine nucleus like the Anonaine 3 and the Nornuciferine 4. The isolating and purification process of these alkaloids was carried out through the application of the following spectroscopic techniques (CC, CCD and CCDP). The structural elucidation was done through the use of spectroscopic techniques such as IR, UV, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C mono and bi-dimensional, y EM, as well as by comparisons of authentic samples.*

*Regarding the chloroformic extracts obtained from bark and wood, and the sub-fractions, the evaluation of the antioxidant activity was carried out by using the methodology of DPPH, obtaining a good receptive capacity of free radicals from the assayed extracts.*

**KEYWORDS:** Alkaloids, Annonaceae, Aporphines, Oxo-aporphines *Rollinia Pittieri*, antioxidant.

### 1. INTRODUCCIÓN

En género *Rollinia* se han encontrado diferentes tipos de metabolitos secundarios como: acetogeninas, alcaloides, lignanos entre otros [1]. A los alcaloides encontrados se les ha comprobado diferentes tipos de actividades biológicas como antiagregación plaquetaria, antifúngica, antimicrobiana y citotóxica [2, 3]. Las investigaciones de la gran actividad hallada en el género *Rollinia* permiten el desarrollo de estudios tendientes a la búsqueda de compuestos naturales con actividad biológica promisoría. El presente estudio describe la presencia de cuatro alcaloides obtenidos de la corteza y madera de *Rollinia pittieri*: *O*-metilmoschatolina **1**, Liriodenina **2**, Anonaina **3** y Nornuciferina **4**.

Los alcaloides **1** y **2** son oxoaporfínicos. Recientemente de los tallos de *Rollinia pittieri* se aislaron 2 alcaloides

### OMAR TORRES

Lic. en Química y Biología, MsC  
Profesor Asistente  
Universidad de Córdoba  
omartrres@hispanvista.com

### GILMAR SANTAFE

Lic. en Química. MsC. Ph.D  
Profesor Titular  
Universidad de Córdoba  
gsantafe@sinu.unicordoba.edu.co.com

### ALBERTO ANGULO

Lic. en Química y Biología, MsC  
Candidato a Ph.D  
Universidad de Córdoba  
aanguloo@hotmail.com

### HILTONY VILLA

Químico Farmacéutico  
Profesor Titular  
Universidad de Córdoba  
hilltny@latinmail.com

### JUAN ZULUAGA

Lic. en Química y Biología, Ms.C  
Profesor Asistente  
Universidad de Córdoba  
jucasive@hotmail.com

### MARIA DORIA

Lic. en Química y Biología, Ms.C  
Profesor Asistente  
Universidad de Córdoba  
mariadoria@sinu.unicordoba.edu.co

con actividad antioxidante según el método de DPPH entre ellos el compuesto **1** la *O*-metil-moschatolina, y la Melosmina un compuesto con núcleo 7,7-dimetil-1,2,3,9-tetrahidroaporfínico [4]. Los alcaloides **3** y **4** pertenecen al grupo de los Nor- aporfínicos, los cuales se han encontrado que poseen efectos inhibidores de la tirosina fosfatasa en la proteína CD45[5] y actividad antimalárica *in vitro* [6] y Antifúngica [7].

### 2. METODOS Y MATERIALES

**2.1 Recolección del material vegetal:** El material vegetal de corteza y madera fue colectado en la vereda el Reposo en el municipio de Valencia Departamento de Córdoba, Colombia. La identificación botánica como *Rollinia pittieri* (Annonaceae), fue realizada por el

Doctor Álvaro Cogollo del Jardín Botánico “Joaquín Antonio Uribe”. Universidad de Antioquia.

**2.2 Extracción y Aislamiento:** El material de corteza y madera seca y molida se sometió a extracciones sucesivas con etanol al 96% mediante el método de maceración en frío. El extracto etanólico de corteza y madera se le realizó un desengrase con hexano y luego se hizo la extracción clásica de alcaloides totales, donde el extracto se disuelve en HCl diluido con el fin de obtener los alcaloides totales en forma de sales y extraerlos luego puros en medio básicos con diclorometano.

A una porción del extracto de alcaloides totales de la corteza (0.5 g) se le realizó cromatografía en columna (CC) usando sílica-Gel y cloroformo-hexano (9:1) como fase móvil, donde se obtuvieron diez fracciones (F1-F10). La fracción F5 (200 mg) se sometió al proceso de purificación en cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) empleando el sistema cloroformo-hexano (9:1), purificándose el compuesto **1** (15 mg) y el compuesto **2** (12 mg).

El extracto de alcaloides totales de la madera (1 g) fue fraccionado por cromatografía en columna (CC) en sílica-Gel usando el sistema cloroformo-hexano (8:2), las fracciones reunidas fueron purificadas por cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) empleando el sistema cloroformo-metanol (98:2) obteniéndose los compuestos **3** (17 mg) y el compuesto **4** (9 mg).

**2.3 Ensayo de actividad antioxidante:** Para evaluar los extractos de corteza y madera se empleó el ensayo de actividad antioxidante basado en la decoloración del radical DPPH, seguida por espectrofotometría ultravioleta acorde al protocolo propuesto por Brand-William [8], el ensayo se realizó utilizando concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 ppm y un blanco del radical. Este ensayo se hizo por triplicado finalmente se evaluó el porcentaje de inhibición o decoloración correspondiente a cada concentración de muestra evaluada y lograr determinar la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del extracto etanólico de corteza y madera de la especie *Rollinia pittieri* fueron aislados e identificados cuatro alcaloides. Los alcaloides aislados corresponden a: *O*-metilmoschatolina **1**, Liriodenina **2**, Anonaina **3** y Normuciferina **4**.

El compuesto **1** fue identificado como el alcaloide Oxoaporfinico *O*-Metilmoschatolina (**Figura 1**); sólido naranja. En el espectro EIMS se observa un ión molecular en  $m/z$  321, consistente con la fórmula molecular  $C_{19}H_{15}NO_4$ , da positiva el ensayo de Dragendorff en placa. El espectro IR:  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ), muestra señales a 1689 (característica del grupo C=O), 1459 y 1380 que son bandas típicas de sistemas aromáticos. El análisis de RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz) permite establecer la presencia de 15 protones,

destacándose las señales características de 4 protones en la región aromática. Así  $\delta$ : 8.58 (1H, dd,  $J=7.8$  Hz, 1.4 Hz),  $\delta$ : 7.55 (1H, ddd,  $J=7.8$  Hz, 7.1 Hz);  $\delta$ : 7.76 (1H, ddd,  $J=7.8$ Hz, 7.1 Hz, 1.4 Hz),  $\delta$  9.11 (1H, d,  $J=8.3$ ); las características espectrales evidencian que los cuatro protones están unidos a un anillo aromático de manera contigua, lo cual se corrobora con el experimento  $^1H$ - $^1H$ -COSY (**Figura 2**). También se observan las señales correspondientes a los protones  $\delta$ : 8.97 (1H, d,  $J=5.3$ ) y  $\delta$ : 8.22 (1H, d,  $J=5.3$ ), que son propias de un sistema de protones acoplados pertenecientes a un sistema AB aromático. Las señales  $\delta$ : 4.08 (O-CH<sub>3</sub>, s),  $\delta$ : 4.18 (O-CH<sub>3</sub>, s) y  $\delta$ : 4.10 (O-CH<sub>3</sub>, s) representan un sistema de nueve protones pertenecientes a tres grupos metoxilos unidos a anillo aromático. El análisis de RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz) técnica DEPT, permite establecer la presencia de diecinueve átomos de carbono (**Tabla 1**). El experimento HMQC establece las correlaciones correspondientes a los protones asignados a la estructura con sus respectivos carbonos y con el análisis de la técnica HMBC a dos, tres y cuatro enlaces, se corroboraron las asignaciones hechas a los protones y carbonos presentes en la estructura, específicamente las posiciones de los carbonos de los anillos aromáticos y de los carbonos presentes en los grupos metoxilo (**Figura 1**).

El compuesto **2** identificado como el alcaloide Liriodenina (**Figura 1**), sólido amarillo, al igual que el compuesto **1** presentó un núcleo Oxoaporfinico, diferenciándose en las sustituciones que se encuentran en las posiciones 1, 2 y 3 del núcleo básico; los resultados de RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz) muestran la señal  $\delta$ : 6.37 (2H,s), correspondientes a protones de un grupo metilendioxi ubicado en las posiciones 1 y 2; además se observa la señal para un protón aromático a  $\delta$ : 7.17 (1H, s) característica el protón ubicado en la posición 3. El análisis espectral de RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz) muestra una señal a  $\delta$  102.0 característica de un carbono metilénico perteneciente a un grupo metilendioxi (O-CH<sub>2</sub>-O), que esta ubicado en las posiciones 1 y 2 del núcleo oxoaporfinico, además se observó una señal para un carbono aromático metínico no oxigenado a  $\delta$ : 124.3, que a diferencia del compuesto **1**, donde este carbono aparece como cuaternario y mucho más desplazado a campo bajo a  $\delta$ : 148.4, lo que indica que esta posición está sustituida por un grupo oxigenado como un metoxilo (OCH<sub>3</sub>) en la posición 3 estas características espectrales permiten establecer la diferencia estructural entre el compuesto **1** y **2**, las demás señales se muestran en la **Tabla 1**. Las correlaciones C-H a dos tres y cuatro enlaces observadas en el espectro HMBC que permiten confirmar las señales asignadas a la estructura se muestran en la **Figura 1**.

El compuesto **3** se identificó como el alcaloide Anonaina (**Figura 2**). El espectro de masas de la sustancia **3** indica un peso molecular de 265 que corresponde a una fórmula  $C_{17}H_{15}NO_2$ . Presenta máximas de absorción en el UV de

234, 273, 314 nm característicos de alcaloides Nor-aporfinicos. El espectro **IR** indica la presencia de bandas típicas del anillo aromático: 2948 y 1560, 1152, 1084, 945  $\text{cm}^{-1}$ . Su espectro de **RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) mostró la presencia de 5 protones aromáticos, dos protones de un grupo metilendioxi y en la región alifática aparecen siete señales características de protones alifáticos. Los acoplamientos de los protones en el anillo B, C y D fueron corroborados con el experimento  **$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY** (**Figura 2**). El protón 3 pertenece al anillo A  $\delta$ : 6.568(1H, s), los protones 4, 5 y 6a pertenecientes al anillo B  $\delta$ : 3.02(1H, m),  $\delta$ : 2.66(1H,m),  $\delta$ : 3.41(1H, m), 3.04(1H,m),  $\delta$ : 4.05(1H, m) respectivamente, a su vez los protones en la posición 7  $\delta$ : 2.95(1H, m),  $\delta$ : 2.84 (1H, t), ubicados en el anillo C, los protones 8, 9, 10, 11  $\delta$ : 7.25(1H ,m),  $\delta$  7.23(1H ,m);  $\delta$  7.31 (1H, m),  $\delta$  8.07(1H,d, J: 8 Hz); pertenecen al anillo D de la Nor-aporfina. Además los protones correspondientes al metilendioxi  $\delta$  6.08 (1H,d, J: 1.2),  $\delta$ 5.94(1H, d, J: 1.2 Hz) unido al anillo A. El espectro de **RMN $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) y la técnica **DEPT 135** mostraron siete carbonos cuaternarios, entre ellos los carbonos 1 y 2 sustituidos por el grupo metilendioxi. Muestra además la presencia de cuatro grupos metilenos y seis grupos metínicos (**Tabla 1**). El espectro **HMQC** permitió observar los carbonos correspondientes a los protones aromáticos ya identificados, y con la ayuda de la técnica **HMBC** se logró comprobar las posiciones de los carbonos en cada uno de los anillo y en la estructura general (**Figura 2**).

La sustancia **4** se identificó como el alcaloide Normuciferina (**Figura 2**), el cual se analizó por las mismas técnicas espectroscópicas empleadas para la sustancia **3**. El espectro de masas indica un peso molecular de 281 para una fórmula  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ . El espectro de **RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) muestra en la región aromática señales de los protones 8, 9, 10, 11 a  $\delta$  7.31(1H, m),  $\delta$  7.23(1H,m),  $\delta$  7.24(1H,m),  $\delta$  8.39 (1H, d , J: 7.6Hz), y el protón 3  $\delta$ 6.65(1H,s). Estas señales presentan características semejantes a la propuesta para el núcleo del alcaloide Nor-aporfínico de la sustancia **3** (**Tabla 1**). A campo alto en la región alifática se observan señales a  $\delta$  4.05(1H, m),  $\delta$  3.62(2H,dd),  $\delta$  3.15 y  $\delta$  3.03 (2H,m),  $\delta$  2.82(2H,dd). Además de éstas aparecen dos señales en la región alifática integrando cada una para tres (3) protones con desplazamiento a  $\delta$  3.893 y  $\delta$  3.668 ppm, correspondiente a protones de grupos metoxilo unidos a anillos aromáticos, a diferencia de la sustancia **3** las señales a  $\delta$  6.085 y  $\delta$  5.940 ppm; característica de protones presentes en un grupo metilendioxi no aparecen en la sustancia **4**. Los acoplamientos típicos de los protones pertenecientes a la sustancia **4** fueron similares a la sustancia **3**; lo que se comprueba con el experimento  **$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY** (**Figura 2**). El análisis espectral de **RMN $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) y la técnica **DEPT** mostraron 7 carbonos cuaternarios; dos de los cuales corresponden a sustituciones de grupos metoxilos en los carbonos 1 y 2, muestra además la

presencia de dos grupos metilos, tres metilenos y seis grupos metínicos (**Tabla 1**). Al igual que la sustancia **3**, los espectros de **HMQC** y **HMBC** permitieron corroborar las diferentes asignaciones y posiciones de los carbonos en cada uno de los anillos (**Figura 2**).

**Evaluación de la actividad antioxidante:** Los resultados obtenidos muestran un valor de  $\text{IC}_{50}$  por debajo de 100 ppm para los extractos de corteza y madera; lo que se considera una buena actividad antioxidante si se comparan con los estándares empleados en la industria como el BTH, BHA y Acido ascórbico. Esto probablemente esta relacionado con la presencia de compuestos con buena capacidad captadora de radicales libres, como algunos alcaloides y flavonoides ya aislados en esta especie [1,4]. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  para cada uno de los extractos se muestra en el **Gráfico 1**.

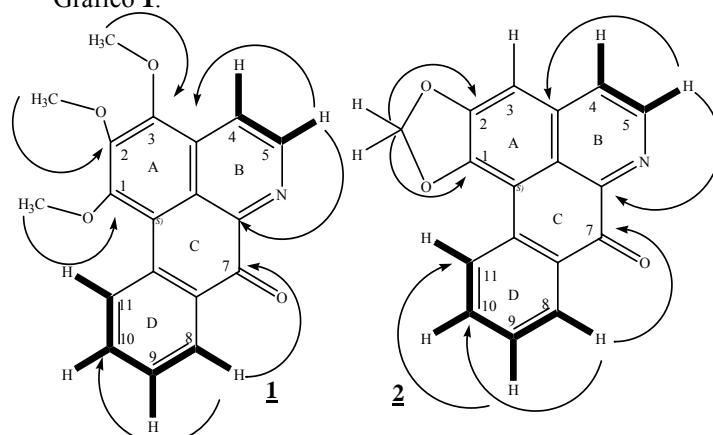


Figura 1.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC del Compuesto **1** y **2**

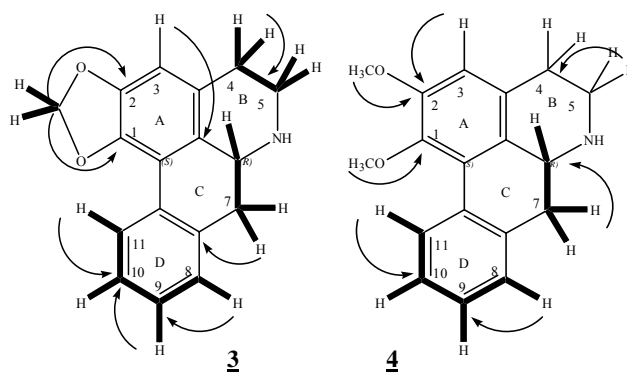


Figura 2.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC del Compuesto **3** y **4**

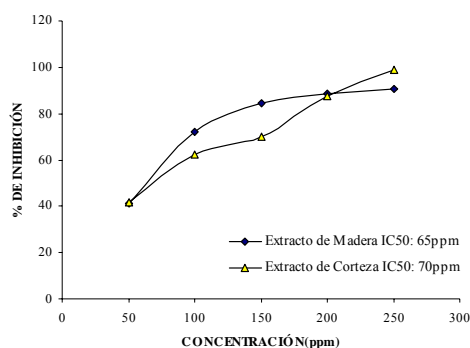


Gráfico 1.  $\text{IC}_{50}$  Para los extractos de corteza y madera.

Átomo	RMN <sup>13</sup> C (ppm)				RMN <sup>1</sup> H (ppm)				J (Hz)	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
1	147.3	148.2	142.5	145.7						
1a	115.7	108.5	116.1	126.8						
1b	122.3	123.5	127.3	127.3						
2	156.4	152.1	146.9	152.9						
3	148.4	103.5	107.8	111.6		7.17(s)	6.56(s)	6.65(s)		
3a	131.1	136.0	126.3	125.1						
4	119.1	124.1	28.8	27.2	8.22(d)	7.76(d)	3.02(m) 2.66(m)	2.82(dd)	5.3	5.2
5	119.1	145.2	43.0	42.1	8.97	8.88	3.41(m) 3.04(m)	3.62(dd)	5.3	5.2
6a	145.5	145.7	53.2	55.2			4.00(dd)	4.05(m)		
7	182.6	182.7	36.8	35.6			2.95(m) 2.84(d)	3.15, 3.03(m)		
7a	131.8	131.6	134.8	134.6						
8	128.9	128.6	128.1	128.5	8.58(dd)	8.58(dd)	7.25(m)	7.31(m)	7.8,1.4	7.9,1.2
9	128.8	128.3	127.5	127.4	7.55(ddd)	7.57(ddd)	7.23(m)	7.23(m)	7.8,7.1	7.8,7.4
10	134.3	133.7	127.0	127.7	7.76(ddd)	7.73(ddd)	7.31(m)	7.24(m)	7.8,7.1,1.4	7.9,7.3,1.2
11	128.1	127.2	127.0	128.0	9.11(d)	8.63(d)	8.07(d)	8.39(d)	8.3	8.0
11a	134.5	133.1	131.0	131.7						
1-O-CH <sub>3</sub>	60.9			60.2	4.80(s)			3.66(s)		
2-O-CH <sub>3</sub>	61.4			55.9	4.18(s)			3.89(s)		
3-O-CH <sub>3</sub>	61.8				4.10(s)					
1,2 O-CH <sub>2</sub> -O		102.3	100.7			6.36(s)	6.08(d) 5.94(d)			

Tabla 1. Datos RMN <sup>13</sup>C, RMN <sup>1</sup>H de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4**.

#### 4. CONCLUSIONES

De los extractos etanólicos de corteza y madera se aislaron e identificaron cuatro alcaloides. De la corteza dos alcaloides oxoaporfínicos denominados *O*-metilmoschatolina y liriodenina. Este aislado por primer vez en la especie *Rollinia pittieri*. De la madera fueron aislados dos alcaloides con núcleo Nor-aporfínico denominado Anonaina y normuciferina, ambos aislados por primer vez en la especie *Rollinia pittieri*.

Los alcaloides aislados son de tipo aporfínicos, núcleo característico de este tipo de compuesto presente en especies del género *Rollinia*, lo que se constituye en una herramienta quimicotaxonómica en el estudio de este género. Cabe destacar que la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de corteza y madera ensayados frente al radical libre DPPH, constituyen una información valiosa, ya que todos mostraron una buena capacidad captadora de radicales libres, lo que impulsa a realizar un estudio químico completo de los compuestos de cada uno de estos extractos con el propósito de identificar las sustancias más promisorias como antioxidantes naturales.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

[1] TORRES, A. y VILLA, H. Estudio químico y obtención de principios activos de las especies *Rollinia pittieri* (Annonaceae) del Alto sinú. Informe final de Investigación. Universidad de Córdoba. 13-21. 2006.

[2] KUO, R, Y., *et al.* Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, 57, 421-425. 2001.

[3] CHEN, K.S.; Ho, F.R.; Teng, C.M, *et al.* Antiplatelet and vasorelaxing action of some aporphinoids. *Planta Med.* 62 (2), 133-136. 1996.

[4] MONTROYA, G. *et al.* Actividad Captadora de radicales Libres de Alcaloides de *Rollinia Pittieri* (Annonaceae) Por El Método de DPPH. *Vitae*. 11, (2), 51-57. 2004.

[5] MISKI, M., *et al.* Aporphine Alkaloids, CD 45 Protein Tyrosine Phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*. 5 (4) 1519-1522.1995.

[6] SÁENZ A., *et al.* Aporfínicos en corteza de *Guatteria lehmannii* y evaluación de su actividad antimalárica *in vitro*. *Revista Colombiana de Química*. 26(1)1-9.1997.

[7] SÁENZ, J., *et al.* Alcaloide en la corteza de la *Rollinia membranacea*, Annonaceae. *Química Actualidad y Futuro*. 2(2) 90-94, 1993.

[8] BRAND, W., *et al.* Use of a Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.* 21 269-277.1995.